

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ»**

Факультет біотехнології і біотехніки
(повна назва інституту/факультету)

Кафедра промислової біотехнології
(повна назва кафедри)

Дипломний проект

на здобуття ступеня бакалавра

з напрямку підготовки 6.051401 Біотехнологія
(код і назва)

на тему: Технологія виробництва імуноферментної тест-системи
для виявлення антитіл до вірусу гепатиту С.
Дільниця підготовки посівного матеріалу.

Виконав: студент 4 курсу, групи БТ-21
(шифр групи)

Васильєва Альона Денисівна
(прізвище, ім'я, по батькові) (підпис)

Керівник Проф. каф. пром. біотехнології, д.ф.-м.н.,
проф. Литвинов Г.С.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали) (підпис)

Консультант Розділ 5 доц., к.т.н. Ружинська Л.І.
(назва розділу) (посада, вчене звання, науковий ступінь, прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент к.т.н., старший викладач Козар М.Ю.
(посада, науковий ступінь, вчене звання, науковий ступінь, прізвище та ініціали) (підпис)

Київ – 2016 року

У світі давно існує проблема гепатиту С, який раніше був проблемою молодого віку, але з часом вік людей які хворіють на гепатит С збільшується. Гепатит має багато позапечінкових проявів, що ускладнює його діагностику та може перешкоджати призначенню відповідного лікування. Україна належить до країн із середнім рівнем поширення вірусного гепатиту С — інфіковано $\approx 3\%$ громадян, що становить ≈ 1 млн 170 тис. осіб. Однак, за результатами вибіркового моніторингу груп ризику, рівень інфікування вірусом гепатиту С серед деяких із них значно перевищує середньосвітові показники і сягає 40–60%. Тому постала проблема точного, а також кількісного виявлення цієї хвороби. На відміну від вірусного гепатиту В, де можливе виділення антигену, клінічна діагностика гепатиту С проводиться такими методиками: антитіла IgM до вірусу визначаються за допомогою ІФА та РИБА, а також виявленням в крові вірусної РНК за допомогою ПЛР. При цьому ПЛР здійснюється двічі, оскільки є ймовірність хибнопозитивної реакції.

Нині ІФА набув великої популярності завдяки, насамперед через його високу чутливість (окремі його модифікації дозволяють визначати до 10^{*18} моль/л антигену) та специфічність (майже 100 %), також тим, що можна кількісно визначати антитіла у широкому діапазоні концентрацій із використанням лише одного розведення сироватки або плазми. ІФА дозволяє також легко розрізняти антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів. При правильному доборі відповідного антигену, що зв'язується з носієм, та оптимального кон'югату з ферментною міткою можна створити системи тестування дуже багатьох різноманітних антитіл.

Але не дивлячись на велику кількість варіантів імуноферментного аналізу досі йде його удосконалення. Так, наприклад однією з проблем тест-систем є те, що існує «імунологічний слід» - «слід» від вже перенесеної інфекції. У відповідь на впровадження інфекції організм починає виробляти антитіла, зокрема, антитіла класу IgG. Ці антитіла «вловлює» ІФА-аналіз.

Тобто вже після перенесеної хвороби такі тест системи можуть дати хибні результати. В таких випадках застосовують ПЦР-аналіз, який реагує тільки на наявність молекул ДНК інфекції в організмі. Для того щоб уникнути дороговартісного лікування, яке в 2014 році вдалось знизити з 14000\$ до 5000\$ та достатньо тривалому лікуванню потрібно вчасно проходити діагностику. Так, наприклад, кожного року в кожному місті України проходить акція за допомогою якої можна безкоштовно пройти тест на гепатит С.

Актуальність даної роботи полягає в тому що своєчасна діагностика гепатиту С може значно зменшити вартість та тривалість лікування, а також тест-система є більш унікальною в виявленні хвороби, тому виробництво цієї ІФА системи важливе для здоров'я країни.

Мета роботи: розробити виробництво імуноферментної тест-системи для виявлення антитіл до гепатиту С, підібрати кращий штам для отримання білку.

Завданням дипломного проекту було:

1. Підібрати і охарактеризувати продуцент для виробництва рекомбінантного білка.

2. Розглянути основні фізико-хімічні характеристики кінцевого продукту та біохімічні основи його виробництва.

3. Провести аналіз методів створення високопродуктивних промислових продуцентів, обґрунтувати схему отримання продуценту, що використовується у проекті.

4. Надати характеристику сировини, матеріалів, напівпродуктів, що використовуються у виробництві, скласти матеріальний баланс стадії біосинтезу, обрати технологічну й апаратурну схему.

У першому розділі «Характеристика біологічного агента» було розглянуто *Escherichia coli* PLT90, як продуценту білку-антигену та штаму, який має низький рівень деградації білків, синтезованих з використанням промоторів фага лямбда. За визначником бактерій Берджі штам *Escherichia*

PLT90 відноситься до групи грам негативної факультативно анаеробної палички. На щільних поживних середовищах росте округлими колоніями, з гладким краєм. Поверхня колоній рівна. На МПА колонії прозорі з сіривато-блакитним відливом, легко зливаються між собою. *E. Coli* може розмножуватись простим діленням на середовищах, що мають в своєму складі тільки іони Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} мікроелементи та джерело вуглеводів (наприклад глюкозу).

E. coli можна культивувати як в аеробних (у присутності кисню), так і в анаеробних (без кисню) умовах. Проте для оптимальної продукції рекомбінантних білків *E. coli* і інші мікроорганізми зазвичай вирощують в аеробних умовах. Якщо метою культивування бактерій в лабораторії є синтез і виділення певного білка, то культури вирощують на складних рідких живильних середовищах в колбах.

Для отримання посівного матеріалу запропоновано використовувати LB середовище.

У другому розділі «**Біохімічні основи виробництва**» розглянуто характеристику NS3 білку, та методи його очищення, приведено компонентний склад тест- системи та сфери застосування білку.

Як метод очищення білку було запропоновано металлохелатна афінна хроматографія при якій осад суспендують після обробки ультразвуком, центрифугують і кінці незв'язаний матеріал вимивають буфером В, поки базова лінія не повертається до нуля.

У третьому розділі «**Методи отримання промислових продуцентів**» наведено методи створення високопродуктивного промислового продуценту та різні штами *E. coli*, які використовуються на різних підприємствах. Для створення промислового продуценту було використано трансформацію. При виборі даного методу керувалися тим, що даний метод підходить для *E. coli*, так як при такому підході з клітини виділяють білок, клонують ген цього білка, модифікують його, створюючи мутантний ген, що кодує змінену

форму білка. Отриманий ген вводять в клітину. Якщо він експресується, несуча його клітка і її нащадки будуть синтезувати змінений білок.

У четвертому розділі «Технологічна частина» було охарактеризовано кінцевий продукт у вигляді готової імуноферментної тест-системи, було наведено сировину, матеріали та напів продукти, що використовується на всьому виробництві та розраховано матеріальний баланс стадії отримання посівного матеріалу. Наведено контрольні точки, що забезпечують виконання технологічного режиму.

У п'ятому розділі «Розрахунок обладнання для проведення технологічного процесу» обрано та обгрунтовано конструкцію посівного апарату для отримання посівного матеріалу *E. coli*. Розрахований посівний апарат має робочий об'єм 25 літрів, коефіцієнт заповнення 0,6, та має лопатеву мішалку, яка дозволяє культурі рости по всьому об'єму апарата. Також було обгрунтовано вибір загальнозаводського обладнання та наведені вимоги до охорони праці та навколишнього середовища.

В результаті роботи було спроектовано виробництво імуноферментної тест-системи DIA-HCVIII для виявлення специфічних антитіл до вірусу гепатиту С.

1. Обгрунтовано вибір *E. coli* як продуценту рекомбінантного білку, як найбільш вивченого мікроорганізму та такого, який легко культивується.
2. Для накопичення інокуляту було обрано стандартне середовище з крохмалу і гліцерину, а в якості середовища для накопичення біомаси було обрано середовище LB, яке використовується саме для виділення рекомбінантного білку з *E. coli*.
3. Враховуючи особливості технології тест-системи, розроблені технологічна та апаратурна схеми лінії виробництва та наведені параметри контролю, виконання яких забезпечує належну якість продукції та безпеку персоналу.
4. Для виробничого культивування було підібрано та розраховано ферментер об'ємом $0,025\text{м}^3$, який забезпечує оптимальні умови росту

бактеріальної культури. Технологічний, конструктивний та гідравлічний розрахунки апарату підтверджують надійність обраної конструкції.

5. Проект виконано з урахуванням вимог охорони праці, пожежної та екологічної безпеки, проаналізовано шкідливі та небезпечні фактори виробництва та запропоновано методи їх попередження та уникнення в умовах виробництва.